Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 20, No. 1, Mar.-Apr. 2024, p. 101-117

Effect of Using Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* as Free Form and as a Carrier Nanocapsules in Formulation of Tomato Paste and Evaluating Microbial and Qualitative Characteristics of the Product During Storage at Refrigerator

S. Reyhani Poul[1], S. Yeganeh[2*], Z. Raftani Amiri[3]

1- Ph.D Graduate, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3- Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
(*- Corresponding Author Email: s.yeganeh@sanru.ac.ir)

Received: 12.10.2022 Revised: 29.11.2022 Accepted: 18.12.2022 Available Online: 21.12.2022	**How to cite this article:** Reyhani Poul, S., Yeganeh, S., & Raftani Amiri, Z. (2024). Effect of using astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* as free form and as a carrier nanocapsules in formulation of tomato paste and evaluating microbial and qualitative characteristics of the product during storage at refrigerator. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 20*(1), 101-117. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.79065.1210

Introduction

Since heat treatments and special standards are not used in the production of traditional (homemade) tomato paste, fungal and bacterial spoilage in the product occurs extensively during storage in the refrigerator (4°C). Astaxanthin extracted from aquatics has antimicrobial activity and color similar to tomato and can probably be effective in preventing spoilage of tomato paste. In addition, astaxanthin has other properties in the field of preventing and controlling diseases and maintaining human health, which justifies its use in food formulations as an enrichment. Since heat, enzyme, acid, etc. treatments are practiced during the production of tomato paste, these factors may change the structure and thus the function of astaxanthin. For this reason, astaxanthin nanoencapsulation is necessary for its use in tomato paste formulation.

Materials and Methods

In this research, first, astaxanthin was extracted from *Haematococcus pluvialis* microalgae using the acid-acetone combined method. Then, this pigment was nanoencapsulated using maltodextrin-sodium caseinate coating and the resulting nanocapsules were used together with the pure form of astaxanthin in the formulation of tomato paste. The research treatments were control, tomato pastes containing 3 and 6% astaxanthin (A and B, respectively) and also 3, 6 and 9% nanocapsules carrying the pigment (C, D and E, respectively). These treatments were kept at refrigerator for 28 days and were evaluated (on days 0, 7, 14, 21 and 28) in terms of the total number of fungi, Howard's number (HMC), pH, fungal flora, total bacteria count, amount of lactic acid bacteria and sensory properties. This research was conducted in a completely randomized design. Data were analyzed by One-way Anova and the difference between the means was evaluated by Duncan's test at 95% confidence level.

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.79065.1210

Results and Discussion

The results showed that the fungi proliferation, total count and lactic acid bacteria were slower than the control during the storage period in the treatments containing astaxanthin and its carrying nanocapsules, and the minimum number of the mentioned microorganisms and Howard's number were related to treatments D and E (p>0.05). Treatments C, B and A were ranked next in this respect (p<0.05). The number of fungi in two treatments D and E from day 0 to 28 varied from 128 to 332 cfu/gr. Also, the Howard number of these treatments was recorded from 18 to 34% in the mentioned time period. However, these two indices in the control ranged from 121 to 792 cfu/gr and 18 to 91%, respectively, during the storage period. The count of total bacteria and the amount of lactic acid bacteria in the control on day 28 were equal to 8.9 cfu/gr and 311 mg/kg, respectively, but these two values were recorded in the E and D treatments on the same day, about 4.8 cfu/gr and 110 mg/kg, respectively. Counting the total number of fungi, bacterias and also Howard's number in control and other treatments showed that the effect of nanocapsules carrying astaxanthin on microbial growth and proliferation is significantly greater than pure astaxanthin (p<0.05). The pH of the treatments varied from 3.9 to 5.8 during the storage period and the most standardized pH (3.9-4.4) was recorded in C, D and E (p>0.05) treatments (p<0.05). The pH of two treatments A and B (p>0.05) was higher than the three mentioned treatments and lower than the control (p<0.05). This finding showed that nanocapsules carrying astaxanthin have a greater effect on controlling the pH of tomato paste than pure astaxanthin during storage at refrigerator (p<0.05). The identification of the fungal flora of the treatments on the 28th day confirmed that two genus of *Penicillium* and *Aspergillus* form the main flora of the product. The results of the sensory evaluation of the treatments on day 0 showed that adding astaxanthin and its carrier nanocapsules does not change the color, aroma, taste and texture indicators (subsequently the general acceptance) of tomato paste (p>0.05). On the 28th day, the mentioned sensory indices only in the two treatments D and E were not significantly different from the 0 day, but they changed negatively in the other treatments (p<0.05).

Conclusion

According to the findings of the present research, astaxanthin extracted from *Haematococcus pluvialis* microalgae has the ability to inhibit fungal and bacterial spoilage and stabilize the sensory properties of tomato paste stored at refrigerator. This properties were improved by adding nanoencapsulated pigment using maltodextrin-sodium caseinate combined coating. Since there were no significant differences between the two treatments containing 6% and 9% of nanocapsules carrying astaxanthin (D and E) in terms of quality indices and microbial spoilage, therefore, the treatment containing 6% nanocapsules is introduced as the optimal treatment.

Keywords: Astaxanthin, Carrier nanocapsules, Maltodextrin, Microbial spoilage, Sensory properties, Tomato paste

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۲۰، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۳ ص. ۱۱۷-۱۰۱

اثر استفاده از آستاگزانتین میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* در دو فرم آزاد و نانوکپسول های حامل در فرمولاسیون رب گوجه فرنگی و ارزیابی خصوصیات میکروبی و کیفی محصول طی نگهداری در دمای یخچال

سهیل ریحانی پول [۱]- **سکینه یگانه** [۲*]- **زینب رفتنی امیری** [۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۷

چکیده

در تحقیق حاضر پس از استخراج و تخلیص آستاگزانتین از میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* به روش اسید-استون، از رنگدانه در دو فرم خالص و نانو ریزپوشانی‌شده با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم در فرمولاسیون رب گوجه‌فرنگی سنتی استفاده و خصوصیات میکروبی و کیفی محصول طی ۲۸ روز نگهداری در دمای یخچال ارزیابی شد. تیمارهای تحقیق عبارت بود از شاهد، رب‌های حاوی ۳ و ۶ درصد آستاگزانتین (به‌ترتیب A و B) و همچنین ۳، ۶ و ۹ درصد نانوکپسول‌های حامل رنگدانه (به‌ترتیب C، D و E). نتایج نشان داد که روند تکثیر قارچها، باکتری‌های کل و لاکتیک‌اسید در طول دوره نگهداری در تیمارهای حاوی آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن نسبت به شاهد کندتر و حداقل تعداد میکروارگانیسم‌های مذکور و همچنین عدد هاوارد مربوط به تیمارهای D و E (p>۰/۰۵) بود (p<۰/۰۵). شناسایی فلور قارچی تیمارها در روز ۲۸ موید آن بود که دو جنس *پنی‌سیلیوم* و *آسپرژیلوس* فلور عمده محصول را تشکیل می‌دهند. کمترین و استانداردترین pH در طول دوره نگهداری در تیمارهای C، D و E (p>۰/۰۵) ثبت شد (p<۰/۰۵). pH دو تیمار A و B (p>۰/۰۵) از سه تیمار مذکور بیشتر و نسبت به شاهد کمتر بود (p<۰/۰۵). نتایج ارزیابی حسی تیمارها در روز صفر نشان داد که اضافه‌کردن آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن، شاخص‌های رنگ، بو، مزه و بافت (متعاقبا پذیرش کلی) رب گوجه‌فرنگی را تغییر نمی‌دهد (p>۰/۰۵). در روز ۲۸، شاخص‌های حسی مذکور فقط در دو تیمار D و E (p>۰/۰۵) با روز صفر اختلاف معنی‌داری نداشتند اما در سایر تیمارها به صورت نامطلوب تغییر کردند (p<۰/۰۵). بنابر یافته‌های تحقیق حاضر، آستاگزانتین مستخرج از میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* توانایی مهار فساد میکروبی و ثبات خواص حسی رب گوجه‌فرنگی نگهداری‌شده در دمای یخچال را دارد که این توانایی با نانو ریزپوشانی رنگدانه با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم ارتقا می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: آستاگزانتین، خواص حسی، رب گوجه‌فرنگی، فساد میکروبی، مالتودکسترین، نانوکپسول‌های حامل

۱- دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: s.yeganeh@sanru.ac.ir)
۳- استاد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.79065.1210

مقدمه

رب گوجه‌فرنگی مانند بسیاری از مواد غذایی دیگر به شدت مستعد فساد میکروبی بویژه فساد قارچی است. عوامل مختلفی از جمله چگونگی حمل و نقل، برداشت، تخلیه، شستشوی اولیه، دمای نگهداری، کیفیت گوجه‌فرنگی از نظر سلامت فیزیکی (عدم شکافت) و ... بر میزان و نوع گونه باکتری‌ها و قارچها در محصول نهایی موثر هستند (Battilani, 1996). مهم‌ترین اثر رشد قارچها در رب گوجه‌فرنگی، تولید مایکوتوکسین[1] است. مایکوتوکسین‌ها یا سموم قارچی، ترکیبات آلی هستند که در انتهای فاز رشدی برخی از گونه‌های قارچی تولید و از ۴۰۰ نوع، ۲۰ نوع آن تهدیدی برای سلامت انسان محسوب می شوند. مایکوتوکسین‌ها به دلیل مقاومتشان در برابر فرایندهای حرارتی می‌توانند در محصول نهایی حضور داشته باشند (Arasteh, 1992). از جمله مایکوتوکسین‌های مهم، می‌توان به آفلاتوکسین اشاره کرد که از گونه *آسپرژیلوس فلاووس*[2] تولید می‌شود. *آلترناریا آلترناتا*[3] گونه قارچی دیگریست که می‌تواند مایکوتوکسین‌هایی نظیر آلترناریو ل[4]، اسیدتنوآزونیک[5] و آلترناریول‌منومتیل‌اتر[6] و همچنین متابولیت‌های سمی آلترتوکسین[7] ۱ و آلترتوکسین ۲ را تولید و به این طریق کیفیت محصول و سلامت مصرف‌کنندگان را تهدید کند (Hassan, 1995; Samano, 1980). رشد و حضور گونه‌های قارچی در گوجه‌فرنگی و محصول نهایی صرفا به تولید مایکوتوکسین محدود نمی‌شود. بلکه قارچها به طرق مختلف، کیفیت محصول را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند. غالب قارچها همزمان با رشد، pH محصول را به‌صورت قابل ملاحظه-ای افزایش می‌دهند که این عامل نه تنها موجب کاهش کیفیت رب گوجه‌فرنگی می‌شود، بلکه شرایط را برای رشد میکروارگانیسم‌های خطرناک مانند *کلستریدیوم بوتولینوم*[8] فراهم می‌کند (Huhtanen, 1976). رشد گونه‌های قارچی مختلف مانند *آسپرژیلوس فلاووس* و *ژئوتریکوم کاندیدوم*[9] موجب کاهش ویتامین C و قندهای محلول در محصول می‌شود. همچنین برخی از قارچها مانند *آسپرژیلوس نایجر*[10] با داشتن آنزیم‌های پکتین‌متیل‌استراز و یا پلی‌گالاکتوروناز موجب تجزیه پکتین به اسید پکتیک و متانول می‌شوند که این عمل موجب کاهش قوام محصول و سینرسیس[11] می‌شود (Oladiran, 1992). کپک‌ها و مخمرها غالبا در ناحیه سطحی رب گوجه‌فرنگی یافت می‌شوند. در نواحی عمقی‌تر، میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی نظیر باکتری‌های لاکتیک‌اسید قادر به رشد و فعالیت هستند. باکتری‌های لاکتیک‌اسید در سطح یا داخل گوجه‌فرنگی‌های ورودی به کارخانه یافت می‌شوند و نشانه فساد محصول نهایی با این باکتری‌ها، ایجاد بویی مشابه با دوغ است (Porretta & Vicini, 1993). گونه اصلی باکتری‌های لاکتیک-اسید عامل فساد در رب گوجه‌فرنگی، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[12] است که در اثر فعالیت آن نه تنها بوی محصول به‌صورت نامطلوب تغییر می‌کند، بلکه مقدار اسیدیته فرار، اسیدیته کل، اتانول، استیل‌متیل-کربینول، دی‌استیل، اسیداستیک و اسیدلاکتیک در رب افزایش اما مقدار ماده جامد محلول، ماده جامد کل و pH کاهش می‌یابد (Elhami Rad & Shahidi, 2007). از سایر باکتری‌های عامل فساد در رب گوجه‌فرنگی می‌توان به باسیلوس‌های مقاوم به اسید مانند *باسیلوس کوآگولانس*[13] و *باسیلوس سوبتیلیس*[14] اشاره کرد که فعالیت آن‌ها موجب افزایش pH، شوری و تلخی محصول می‌شود (Porretta & Vicini, 1993; Hasan, 1995).

امروزه در تولید رب گوجه‌فرنگی صنعتی با استفاده از فرایندهای دمایی خاص، بسته‌بندی استاندارد و ...، تا حدی از رشد و تکثیر قارچها و باکتری‌ها جلوگیری می‌شود و معمولا محصول نهایی در یک بازه زمانی معقول قابلیت نگهداری در یخچال را دارد. اما در برخی از نقاط کشور، تولید رب خانگی رایج است و تولیدکنندگان این نوع رب گوجه فرنگی نه تنها از آن برای مصرف شخصی استفاده می‌کنند بلکه از فروش آن کسب درآمد نیز می‌شود. توجیه خریداران و مصرف‌کنندگان رب‌های خانگی هم غالبا مربوط به طعم مطلوب‌تر، ایمنی بیشتر و رنگ

1- Mycotoxin
2- *Aspergillus flavus*
3- *Alternaria alternata*
4- Alternariol
5- Tenuazonic acid
6- Alternariol Monomethyl Ether
7- Altertoxin
8- *Clostridium botulinum*
9- *Geotrichum candidum*
10- *Aspergillus niger*
11- Syneresis
12- *Lactobacillus plantarum*
13- *Bacillus coagulans*
14- *Bacillus subtilis*

باکیفیت‌تر (این نوع رب‌ها) نسبت به رب گوجه‌فرنگی صنعتی است. از آنجا که در تولید رب گوجه‌فرنگی خانگی از تجهیزات استاندارد، ظروف بسته‌بندی بهداشتی و نفوذناپذیر و همچنین تیمارهای دمایی خاصی استفاده نمی‌شود، محصول تولیدشده پس از نگهداری در دمای یخچال بشدت در معرض رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها و متعاقبا فساد میکروبی قرار دارد. به همین دلیل استفاده از یک ترکیب ضد میکروبی که مانند محصول، طبیعی و ایمن باشد می‌تواند تا حد زیادی به افزایش ماندگاری این نوع از رب‌ها کمک کند. از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب طبیعی می‌توان به رنگدانه‌های استخراج‌شده از آبزیان مانند آستاگزانتین اشاره کرد (Suganya & Asheeba, 2015; Irna *et al.*, 2017; Safari *et al.*, 2022 a,b). آستاگزانتین ($C_{40}H_{52}O_4$) با وزن مولکولی ۵۹۶/۸ گرم بر مول) رنگدانه‌ای به رنگ قرمز تا صورتی است که از موجودات مختلف از جمله جلبک‌ها، مخمرها، باکتری‌ها، ماهی‌ها و خرچنگ‌های دریایی استخراج می‌شود (Gu *et al.*, 2008). این رنگدانه علاوه بر دارا بودن خاصیت ضد میکروبی (Suganya & Asheeba, 2015; Irna *et al.*, 2017)، به‌عنوان رنگ‌دهنده نیز مطرح است. این ویژگی‌ها در کنار فعالیت ضد سرطانی (Tanaka *et al.*, 1995)، پیشگیری از بیماری قلبی–عروقی و التهابی (Tracy, 1999)، بهبود سلامت چشم (Jacques, 1999)، خاصیت ضد التهابی (Bennedsen *et al.*, 1999)، ضد دیابتی (Uchiyama *et al.*, 2002) و ضد بدخیمی (Palozza *et al.*, 2009)، غنی‌سازی مواد غذایی مختلف از جمله رب گوجه‌فرنگی را با آستاگزانتین توجیه می‌کند.

استفاده از آستاگزانتین در مواد غذایی مختلف به‌عنوان رنگ‌دهنده یا نگهدارنده مستلزم به کارگیری روش حفاظتی مناسب از این رنگدانه است. چرا که طی تولید و نگهداری مواد غذایی استفاده از تیمارهای حرارتی، اسیدی، آنزیمی و همچنین کاربرد یکسری مواد که می‌توانند با آستاگزانتین واکنش دهند و از خاصیت آن بکاهند، احتمالا موجب کاهش کارائی و عملکرد این رنگدانه می‌گردند. امروزه در صنایع غذایی و دارویی، تکنیک نانو ریزپوشانی، مؤثرترین روش جهت محافظت از ترکیبات فعال غذایی و دارویی مانند اسانس‌ها، پپتیدهای زیست‌فعال (Reyhani Poul & Yeganeh, 2022)، آروما، طعم‌ها و همچنین رنگدانه‌های طبیعی (Safari *et al.*, 2022b) است. طی این فرایند کپسولی اطراف ترکیبات فعال (هسته) ایجاد می‌شود که از آن‌ها در شرایط نامساعد از تغییرات احتمالی محافظت می‌کند. این تکنیک موجب افزایش دوام و بقاء ترکیبات فعال، عدم تأثیر فاکتورهای محیطی نظیر pH، نور و اکسیژن بر آن‌ها و همچنین کنترل رهایش مواد محصور در دیواره و در نتیجه تأثیر بیشتر بر کیفیت ماده غذایی می‌گردد (Yan *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2014). به‌منظور نانو ریزپوشانی ترکیبات فعال از پوشش‌های مختلفی جهت تشکیل دیواره استفاده می‌شود. این پوشش‌ها معمولا ساختار پروتئینی، کربوهیدراتی، سلولزی، لیپیدی و ... دارند و از منابع گیاهی، دریایی، حیوانی و میکروبی تهیه می‌شوند. مالتودکسترین از پوشش‌های کربوهیدراتی و از مشتقات نشاسته است که از منابع مختلف نشاسته‌ای مانند سیب‌زمینی، ذرت و گندم تهیه می‌گردد. این ماده به‌دلیل حلالیت بالا در آب و عدم داشتن بو و رنگ شاخص، از مهم‌ترین مواد پلی ساکاریدی جهت ریزپوشانی کردن مواد محسوب می‌شود. کازئینات سدیم از پوشش‌های پروتئینی و برخلاف کازئین در آب محلول است؛ ضمن اینکه حلالیت آن با بالا رفتن دمای آب افزایش می‌یابد (Yan *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2014; Safari *et al.*, 2022b).

تاکنون در هیچ تحقیق داخلی و بین‌المللی، اثر استفاده از آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن در فرمولاسیون رب گوجه فرنگی بر خصوصیات کیفی و میکروبی محصول ارزیابی نشده است. به همین دلیل محققین در قالب طرح دانشگاهی مرتبط با صنعت، قصد دارند برای نخستین بار چنین پژوهشی را انجام دهند. به این صورت که طی تحقیق، ابتدا رنگدانه آستاگزانتین با استفاده از روش ترکیبی اسید–استون از میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* استخراج و (پس از خالص‌سازی) با پوشش ترکیبی مالتودکسترین–کازئینات سدیم نانو ریزپوشانی خواهد شد. نهایتا از آستاگزانتین در دو فرم خالص و نانو ریزپوشانی‌شده در فرمولاسیون رب گوجه‌فرنگی استفاده و روند فساد قارچی و باکتریایی و همچنین ویژگی‌های حسی محصول طی دوره نگهداری در دمای یخچال ارزیابی می‌گردد؛ تا در صورت مثبت بودن نتایج، از این محصول (رنگدانه) و تکنیک در مقیاس صنعتی نیز استفاده شود.

مواد و روش‌ها

مواد

پودر خالص میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* به‌صورت فریزدرای‌شده و با رنگ متمایل به قرمز از شرکت پرتوغذای آبزیان سورنا مازندران تهیه گردید. مالتودکسترین، کازئینات سدیم، محیط سابورد دکستروز آگار[1]، لاکتوفنل کاتن‌بلو[2] و محیط پلیت کانت آگار[3] از شرکت سیگما و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک خریداری شدند.

1- Sabouraud Dextrose Agar
2- Lactophenol Cotton Blue
3- Plate Count Agar

روش‌ها

استخراج، صابونی‌کردن و خالص‌سازی آستاگزانتین

جهت استخراج آستاگزانتین از پودر خالص میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* (پرتوغذای آبزیان سورنا) و روش ترکیبی اسید-استون (پیش تیمار اولیه با اسیدکلریدریک و سپس استخراج با استون خالص) استفاده شد. به این صورت که ابتدا نمونه‌ها تحت تأثیر پیش تیمار اولیه اسیدکلریدریک قرار گرفته و ۱ میلی‌لیتر از اسید ۴ مولار به ۱۰ میلی‌گرم از پودر *هماتوکوکوس* اضافه و مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۷۰ درجه بن‌ماری قرار داده شد. سوسپانسون حاصله، سرد شده و به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از سانتریفوژ، نمونه‌ها دو مرتبه با آب مقطر شستشو و مجدداً سانتریفوژ شدند و در نهایت عمل استخراج بر روی رسوب بدست‌آمده با استفاده از استون انجام گرفت. بدین ترتیب که ابتدا ۴ میلی‌لیتر از استون به رسوب اضافه شد و پس از ۱ ساعت هم‌زدن در دمای اتاق، با استفاده از امواج فراصوت (Hilscher UP200، آلمان)، فرآیند سونیکاسیون به مدت ۱۰ دقیقه در فرکانس ۲۰ کیلو هرتز انجام گرفت. بعد از این مرحله، استون حاوی مایع رویی، با سانتریفوژ نمونه‌ها در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری شد (Dong *et al.*, 2014; Sarada *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2018). به‌منظور هیدرولیز یا صابونی‌کردن رنگدانه آستاگزانتین و تبدیل فرم‌های مونواستر و دی استر آن به فرم آزاد، از روش دواتی و همکاران (Dewati *et al.*, 2020) با کمی تغییر استفاده گردید. بدین‌ترتیب که مخلوط حاوی سود ۰/۰۲ نرمال و عصاره حاوی رنگدانه به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و مکان تاریک قرار داده شد. جهت خالص‌سازی آستاگزانتین از روش یوآن و چن (Yuan & Chen, 2000)، کنگ و سیم (Kang & Sim, 2007)، و سان و همکاران (Sun *et al.*, 2015) با کمی تغییر استفاده شد. عصاره هیدرولیزشده حاوی آستاگزانتین به نسبت ۱:۱:۱ عصاره/آب مقطر/ان‌هگزان مخلوط شده و با سانتریفوژ در دور ۴۰۰۰g به‌مدت ۵ دقیقه، فرآیند جداسازی رنگدانه انجام گرفت. بعد از سانتریفوژ، فاز هگزان جمع‌آوری شده و فرآیند جداسازی، تا بی‌رنگ‌شدن کامل این فاز انجام گرفت. حلال آلی هگزان حاصل از سانتریفوژ با هم ترکیب و با استفاده از آب مقطر تا تنظیم pH در محدوده خنثی شستشو داده شد. در انتهای فرآیند، با استفاده از روتاری در دمای اتاق، حلال پراکنی انجام و سوسپانسیون حاوی رنگدانه، تغلیظ و به ۱۰ میلی‌لیتر کاهش داده شد و جهت تزریق به ستون کروماتوگرافی (Shimatzu، ژاپن) آماده گردید. برای خالص‌سازی آستاگزانتین از روش کروماتوگرافی ستونی استفاده شد. ستون مورد استفاده با استفاده از سیلیکاژل پر شده و بعد از تنظیم پارامترهای مختلف شامل flow rate (۰/۶۵ میلی‌لیتر در دقیقه)، فرکانس (۴۷۶ نانومتر)، دمای ستون (۳۰ درجه سانتی‌گراد) و میزان تزریق (۲۰ میکرولیتر) و نوع ستون (PDA)، دستگاه جهت تزریق آماده شد. ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه تغلیظ‌شده حاوی آستاگزانتین (حاوی یک گرم رنگدانه) جهت تزریق آماده گردید. عمل خالص‌سازی در ابتدا با هگزان/استون (نسبت ۷ به ۳ حجمی/حجمی) به‌مدت ۴۰ دقیقه، سپس با هگزان/دی کلرومتان/استون (به نسبت ۵ به ۲/۵ به ۱ حجمی-حجمی) انجام شد. عمل خالص‌سازی به‌مدت ۹۰ دقیقه انجام گردید. حلال‌های جمع‌آوری در مرحله قبل، با استفاده از دستگاه روتاری خارج شده و رنگدانه باقیمانده مجدداً در ۱۰۰ میلی‌لیتر استون ترکیب شد. بعد از این مرحله، چند قطره آب مقطر به حلال اضافه گردید و ترکیب بدست‌آمده به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه قرار داده شد تا عمل کریستالیزه‌شدن انجام گیرد. رنگ کریستال‌های تشکیل‌شده به رنگ قرمز قهوه‌ای بود. فرآیند فوق مجدداً تکرار و در نهایت نمونه جمع‌آوری شده فریز درایر گردید (Sarada *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2014).

نانو ریزپوشانی‌کردن آستاگزانتین

به‌منظور نانو ریزپوشانی آستاگزانتین، از پوشش ترکیبی مالتودکسترین و کازئینات سدیم با نسبت برابر استفاده و نسبت پوشش ها به هسته نیز ۴ به ۱ در نظر گرفته شد. ابتدا سوسپانسیون همگنی از مالتودکسترین در آب مقطر (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس جهت تهیه پوشش دوم، سوسپانسیونی از کازئینات سدیم در آب مقطر (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) ایجاد و با قراردادن بر روی همزن مغناطیسی و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه، سوسپانسیون همگنی از آن حاصل شد. محلول حاوی کازئینات سدیم (پس از کاهش دما به ۲۵ درجه سانتی‌گراد) به محلول دارای مالتودکسترین اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت افزایش جذب آب نگهداری گردید. در مرحله انتهایی، ۲ گرم آستاگزانتین به محلول حاوی پوشش‌ها اضافه و پس از حل‌شدن آن، جهت تولید نانوکپسول، از دستگاه فراصوت با طول موج ۴۰ کیلوهرتز به‌مدت ۱۵ دقیقه و تعداد ۶ سیکل (زمان هر سیکل ۳۰ ثانیه و زمان استراحت ۱۵ ثانیه بین سیکل‌ها، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. برای کاهش بیشتر اندازه ذرات و افزایش راندمان ذرات نانوکپسوله، از دستگاه هموژنایزر با دور بالا (اولتراتوراکس، IKa، ایتالیا) با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. محلول حاصل از فرآیند، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Vaco 2 Zirbus، آلمان) در فشار ۰/۰۵۱ میلی‌بار و دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک گردید (Yan *et al.*, 2014; Machado *et al.*, 2014; Safari *et al.*, 2022b).

ارزیابی خواص فیزیکی نانوکپسول‌های حامل

میانگین سایز ذرات و شاخص توزیع اندازه ذره‌ای پس از رقیق‌کردن نمونه‌ها به میزان ۱۰ برابر با بافر فسفات نمکی[1] به روش تفرق نور پویا[2] با استفاده از دستگاه زتاسایزر (نانوسایزر، ۳۰۰۰، ساخت انگلستان، شرکت Malvern، زاویه ۹۰ درجه و سل مخصوص با عرض ۰/۰۱ متر) اندازه‌گیری شدند. به‌منظور اندازه‌گیری پتانسیل زتای سطح محصول، از دستگاه زتاسایزر استفاده شد. در این روش نانوکپسول‌ها با استفاده از ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH=۷/۴) به میزان ۱۰ برابر رقیق شدند. ارزیابی پتانسیل زتا در زاویه ۱۷۳ درجه سانتی‌گراد و طول موج ۶۳۳ نانومتر هلیوم – تنگستن (در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام شد (Hasani *et al*., 2018). بازده فرآیند نانو ریزپوشانی نیز با استفاده از روش یان و همکاران (Yan *et al*., 2014) تعیین گردید.

تولید رب گوجه‌فرنگی

تولید رب گوجه فرنگی به روش سنتی و خانگی انجام گرفت. به این منظور، ابتدا تمام گوجه‌ها (واریته برنتا) کامل شستشو و پس از خشک‌شدن به چهار قسمت برش داده شدند و روی آن‌ها نمک پاشیده شد. این گوجه‌ها در ظرف سر بسته به‌مدت ۲۴ ساعت زیر نور آفتاب قرار گرفتند. در مرحله بعد، گوجه‌ها به آب‌کش بزرگی منتقل و با چنگ زدن، پوست آن‌ها جدا گردید. سپس گوجه‌ها به قابلمه مناسب منتقل و بر روی گاز با شعله مستقیم و کم قرار داده شدند. در این مرحله مرتب رب هم زده شد تا ته نگیرد و نسوزد. به‌طور میانگین ۴ تا ۵ ساعت زمان مناسبی است تا رب به غلظت مناسب برسد (بریکس ۱±۳۳) و آب آن کاملا تبخیر شود. نهایتا پس از رسیدن رب به غلظت مناسب، روغن مایع و نمک اضافه و پس از مخلوط‌کردن کامل، شعله خاموش شد (میزان روغن و نمک اضافه‌شده به ازای ۴ کیلوگرم گوجه‌فرنگی به ترتیب ۵۰ و ۲۰ گرم بود). پس از خنک‌شدن، محصول به ظروف شیشه‌ای کوچک دربدار (با حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر) منتقل و آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن با نسبت‌های مطرح‌شده در جدول ۱، به رب گوجه‌فرنگی اضافه شدند. در نهایت ترکیب حاصل به‌صورت کامل هموژن (میکسر هموژنایزر، آراکو) و به‌مدت یک ماه در دمای یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید.

جدول ۱- تیمارهای تحقیق

Table 1- Reasearch treatments

تیمارها Treatments	محتویات Contents
Control شاهد	Tomato paste without astaxanthin رب گوجه فرنگی فاقد آستاگزانتین
A	Tomato paste containing 3% pure astaxanthin رب گوجه فرنگی حاوی ۳ درصد آستاگزانتین خالص
B	Tomato paste containing 6% pure astaxanthin رب گوجه فرنگی حاوی ۶ درصد آستاگزانتین خالص
C	Tomato paste containing 3% nanocapsules carrying astaxanthin رب گوجه فرنگی حاوی ۳ درصد نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین
D	Tomato paste containing 6% nanocapsules carrying astaxanthin رب گوجه فرنگی حاوی ۶ درصد نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین
E	Tomato paste containing 9% nanocapsules carrying astaxanthin رب گوجه فرنگی حاوی ۹ درصد نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین

ارزیابی شاخص‌های فساد میکروبی تیمارهای تحقیق

به‌منظور ارزیابی خصوصیات میکروبی تیمارهای مختلف، نمونه برداری از رب‌های پلمپ پس از بازکردن درب محصول در یخچال در طول دوره نگهداری ۲۸ روزه با فاصله هر ۷ روز انجام شد. جهت نمونه‌برداری، از عمق ۵ سانتی‌متری رب گوجه فرنگی (با دو تکرار) استفاده گردید. به‌منظور بررسی بار میکروبی محصول در طول دوره نگهداری، آزمون‌های مختلف شامل شمارش کلی قارچ‌ها، عدد هاوارد[3]، شناسایی جنس قارچ‌ها، شمارش باکتری‌های کل، تعیین میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید و سنجش pH برای تیمارهای تحقیق انجام شد.

شمارش کلی قارچ‌ها و عدد هاوارد

جهت شمارش کلی قارچ‌ها و ارزیابی روند تغییرات آن‌ها از کشت سطحی در محیط سابورد دکستروز آگار و انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۷ روز استفاده شد (Elhami Rad & Shahidi, 2005). تعیین عدد هاوارد با استفاده از لام مخصوص هاوارد

1- Phosphate-Buffered Saline or PBS

2- Dynamic Light Scattering

3- HMC

و مشاهده ریسه‌های کپکی در زیر میکروسکوب با بزرگنمایی ۹۰× انجام گرفت (Samano, 1980).

شناسایی جنس قارچ‌ها

به‌منظور شناسایی پرگنه‌های قارچی در روز ۲۸ نگهداری، از روش مشاهده با میکروسکوپ استفاده گردید. به این صورت که، روی یک لام شیشه‌ای یک قطره محلول رنگی لاکتوفنل‌کاتن‌بلو ریخته و با آنس حلقوی (در مجاورت شعله)، بخشی از پرگنه قارچ به سطح لام منتقل و حل شد. در مرحله بعد یک لامل روی لام قرار گرفت و نمونه‌ها با استفاده از روغن ایمرسیون و عدسی ۴۰× مشاهده شدند (Elhami Rad & Shahidi, 2005). پس از شناسایی (براساس شکل ظاهری)، پرگنه‌های مربوط به جنس‌های مختلف در کل تیمارها شمارش شدند تا درصد شیوع مربوط به هر جنس مشخص شود. درصد شیوع (فراوانی) هر جنس از قارچ‌ها، به صورت میانگین همه تیمارها در روز ۲۸ گزارش شده است.

شمارش کلی باکتری‌ها و تعیین میزان باکتری‌های لاکتیک-اسید

جهت شمارش کلی باکتری‌ها در رب گوجه‌فرنگی در قالب تیمارهای مختلف، از روش کشت سطحی در محیط پلیت کانت آگار و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت استفاده گردید و نتایج بر حسب لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم[1] گزارش شد (Elhami Rad & Shahidi, 2007). همچنین به منظور اندازه‌گیری میزان باکترهای لاکتیک‌اسید در تیمارهای تحقیق، از روش ترکیبی آنزیمی-اسپکترومتری و کیت ترکیبی اندازه‌گیری باکتری‌های لاکتیک‌اسید استفاده و میزان این باکتری‌ها بر حسب میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش گردید (Birboum, 1997).

اندازه‌گیری pH

سنجش pH تیمارهای تحقیق با استفاده از دستگاه pH متر (7110, WTW, Germany) با دقت ۰/۰۱ در طول دوره نگهداری انجام شد (Arasteh, 1992).

ارزیابی حسی تیمارها

ارزیابی حسی (خواص حسی شامل رنگ، بو، مزه و بافت) تیمارهای تحقیق توسط جمعی از کارشناسان و فارغ‌التحصیلان رشته صنایع غذایی (متشکل از ۷ مرد و ۵ زن با بازه سنی ۲۸ تا ۳۵ سال) در دو روز صفر و ۲۸ انجام شد (ارزیابان از قبل، آموزش‌های تئوری و عملی لازم جهت امتیازدهی و تشخیص ویژگی‌های حسی را گذرانده بودند). به منظور ارزیابی حسی تیمارها، از آزمون هدونیک ۹ نقطه‌ای (۹: بسیار مناسب، ۸: تا حدود زیادی مناسب، ۷: مناسب، ۶: نسبتا مناسب، ۵: نه مناسب و نه نامناسب، ۴: نسبتا نامناسب، ۳: نامناسب، ۲: تا حدود زیادی نامناسب، ۱: بسیار نامناسب) استفاده گردید (Khaleghi *et al*., 2013).

تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way Anova) و آزمون دانکن (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) استفاده شد. از نرم‌افزار آماری SPSS برای آنالیز داده‌ها و نرم‌افزار EXCEL جهت رسم جداول و اشکال استفاده گردید.

نتایج و بحث

خواص فیزیکی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین

خواص فیزیکی ترکیبات فعال نانو ریزپوشانی‌شده، حد و کیفیت عملکرد آن‌ها را تعیین می‌کنند (Reyhani Poul *et al*., 2022). این خواص عبارتند از میانگین سایز ذرات، شاخص توزیع اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و بازده ریزپوشانی. در جدول ۲، خواص فیزیکی نانوکپسول های حامل آستاگزانتین با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم ارائه شده است. مطابق این جدول، میانگین سایز نانوکپسول‌های حامل ۲۶۹/۱ نانومتر می‌باشد. میانگین سایز نانوکپسول‌های حامل رنگدانه فیکوسیانین با پوششی مشابه تحقیق حاضر (مالتودکسترین-کازئینات سدیم) معادل ۳۹۷/۱ نانومتر بود (Safari *et al*., 2022b). شاخص توزیع اندازه ذره‌ای نشان‌دهنده میزان یکنواختی یا غیر یکنواختی سیستم‌های کلوئیدی است. مقادیر بالای این شاخص نشان می‌دهد که ذرات بزرگ و غیر یکنواخت در سیستم کلوئیدی وجود دارند. میزان این شاخص در تحقیق حاضر حاکی از یکنواختی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین است. سایر تحقیقاتی که در این زمینه و زمینه‌های مشابه انجام شدند (Ramezanzade *et al*., 2017; Hasani *et al*., 2018)، مقادیر تقریبا هم‌سطح با پژوهش حاضر برای شاخص توزیع اندازه ذره‌ای گزارش کرده‌اند. پتانسیل زتا شاخصی جهت سنجش وضعیت الکتریکی سیستم‌های کلوئیدی است. کاهش پتانسیل زتا به کمتر از مقدار بحرانی، لایه دوگانه باردار اطراف ذرات را تخریب کرده و موجب تجمیع ذرات (تودەای شدن) می‌گردد (Hasani *et al*., 2018). به‌طور کلی ذراتی که پتانسیل زتای آن‌ها بالاتر از ۳۰+ و یا کمتر از ۳۰- باشد، در بالاترین حد پایداری قرار دارند. پتانسیل زتای سطح نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین در تحقیق حاضر ۴۶/۷۱+

1- Log cfu/gr

میلی‌ولت بود که در سطح استاندارد و پایداری قرار دارد. بازده ریزپوشانی یکی از مهم‌ترین شاخص‌های پایداری ترکیبات کپسوله‌شده است؛ زیرا نشان‌دهنده توانایی نانوکپسول در جلوگیری از خروج هسته درونی می‌باشد. این شاخص در تحقیق حاضر ۸۵/۱۹ درصد ثبت شد. بازده ریزپوشانی در تحقیقی که طی آن رنگدانه فیکوسیانین با پوشش ترکیبی مالتودکسترین- کازئینات سدیم و روشی مشابه با پژوهش حاضر نانو ریزپوشانی شد، ۷۳/۴۱ درصد گزارش گردید (Safari *et al*., 2022b).

جدول ۲- خواص فیزیکی نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین

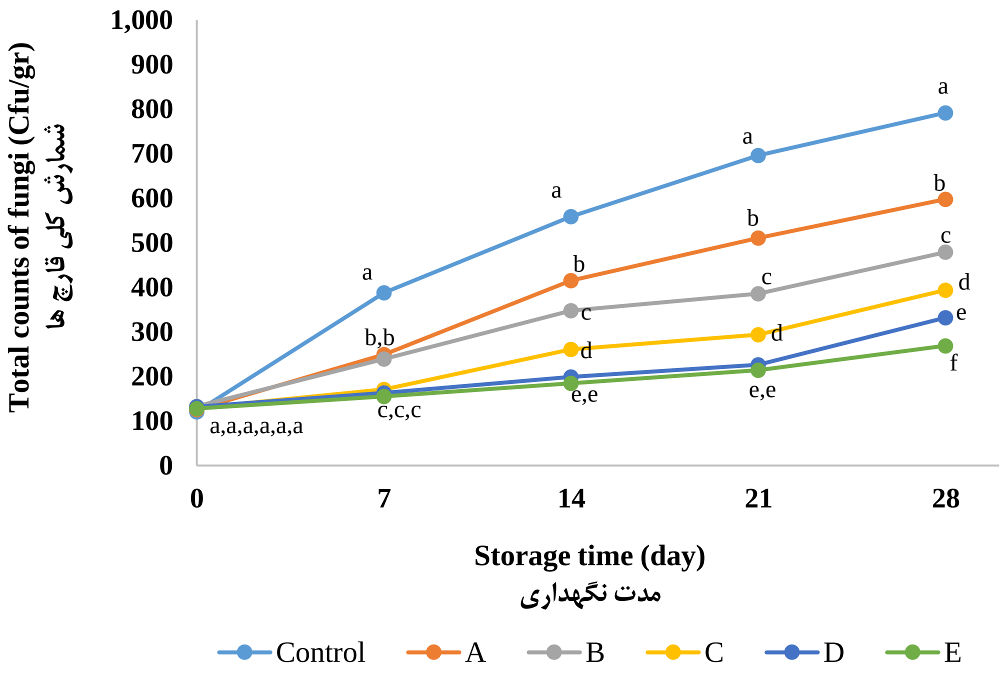
Table 2- Physical properties of nanocapsules carrying astaxanthin

خواص فیزیکی **Physical properties**	سطح **Level**
Average particle size (nm) میانگین سایز ذرات	269.1±3.95
Particle dispersity index شاخص توزیع اندازه ذره‌ای	0.423±1.28
Zeta potential (mv) پتانسیل زتا	+46.71±2.88
Encapsulation efficiency (%) بازده ریزپوشانی	85.19±4.09

خصوصیات میکروبی رب گوجه‌فرنگی فرموله‌شده با مقادیر مختلف آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن

شمارش کلی قارچ‌ها

شمارش کلی قارچ‌ها در رب گوجه‌فرنگی، مناسب‌ترین شاخص جهت سنجش فساد قارچی و ارزیابی روند آن است. از آنجا که در تهیه رب‌های سنتی از تیمارهای حرارتی و استانداردهای خاص استفاده نمی شود، لذا اسپورهای قارچی ممکن است از ماده اولیه، هوا، ظروف بسته- بندی و ... به محصول نهایی راه یابند و آن را آلوده کنند (Elhami Rad & Shahidi, 2005). شکل ۱، شمارش کلی قارچ‌ها در رب گوجه‌فرنگی فرموله‌شده با مقادیر مختلف آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن را نشان می‌دهد. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، در طول دوره نگهداری، کمترین شمارش کلی قارچ‌ها مربوط به تیمارهای E و D (p>۰/۰۵) و بیشترین شمارش مربوط به شاهد است (p<۰/۰۵). البته اختلاف دو تیمار مذکور در روز ۲۸ معنی‌دار شد و تیمار D از نظر شمارش کلی قارچ‌ها در سطح بالاتری قرار داشت (p<۰/۰۵) که این مورد می‌تواند در حد یک خطا و یا استثناء مطرح باشد. تیمارهای C، B و A از نظر شمار کلی قارچ‌ها به‌ترتیب در مراتب بعدی قرار گرفتند و در طول دوره نگهداری، سطح قارچ‌ها در این تیمارها بیشتر از دو تیمار E و D (p>۰/۰۵) و کمتر از شاهد بود (p<۰/۰۵).



شکل ۱- شمارش کلی قارچ‌ها در تیمارهای تحقیق طی دوره نگهداری (Cfu/g)

حروف متفاوت در هر روز نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (p<۰/۰۵).

Fig. 1. Total counts of fungi in the research treatments during the storage period (Cfu/g)

Different letters in each day indicate significant difference between the data (p<0.05).

در ابتدای دوره نگهداری (روز ۷)، سه تیمار C، D و E از نظر شمارش کلی قارچها با یکدیگر اختلاف قابل ملاحظهای نداشتند (p>۰/۰۵). وضعیت مشابهی بین دو تیمار A و B در همین روز ثبت شد (p>۰/۰۵) که دلیل این موارد احتمالا رشد کند قارچها طی بازه زمانی کوتاه نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد است.

عدد هاوارد

عدد هاوارد یک شاخص و روش مبتنی بر اسلاید و میکروسکوپ است که به منظور کنترل کیفی و میکروبی فرآوردههای گوجهفرنگی از آن استفاده میشود. به کمک عدد هاوارد میتوان کیفیت ماده اولیه، وضعیت بهداشتی و مقدار آلودگی محصول به کپک را تخمین زد. در این روش از یک اسلاید ویژه برای شمارش رشتههای قارچ استفاده میشود. در شکل ۲، عدد هاوارد تیمارهای تحقیق در طول دوره نگهداری ارائه شده است. مطابق این شکل، دو تیمار D و E ضمن عدم اختلاف معنیدار در طول دوره (p>۰/۰۵)، حداقل عدد هاوارد را نشان دادند (p<۰/۰۵). تیمارهای C، B، A و شاهد ضمن داشتن اختلاف معنیدار (p<۰/۰۵)، بهترتیب در ردههای بعدی قرار گرفتند (p<۰/۰۵). حد مجاز عدد هاوارد براساس استاندارد کشور ۴۰ تا ۶۰ درصد است (Mortazavi & Tabatabaei, 1997). بنابراین همه تیمارهای تحقیق حاضر به غیر از شاهد و تیمار محتوی ۳ درصد آستاگزانتین خالص (A) طی ۲۸ روز در محدود استاندارد از نظر عدد هاوارد قرار داشتند.

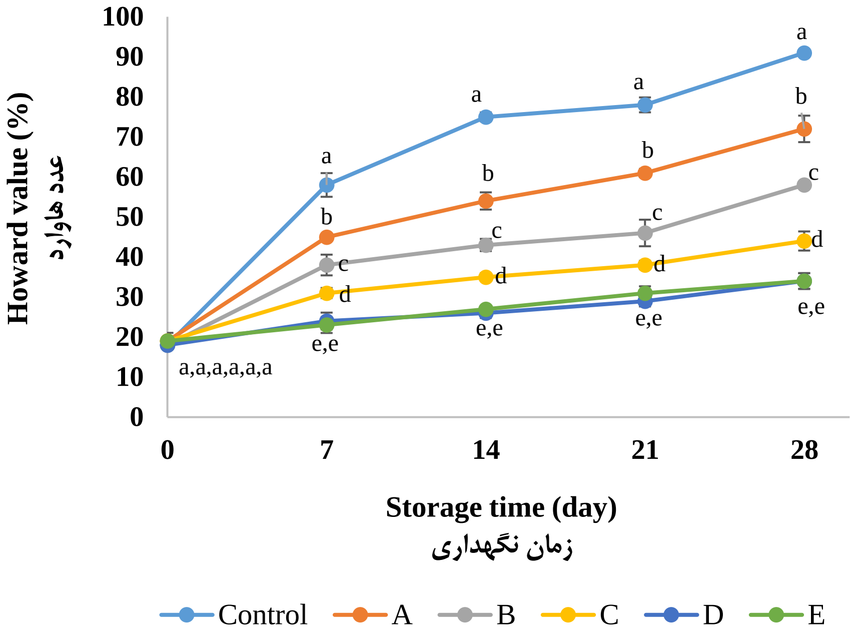
یافتههای شمارش تعداد قارچها و عدد هاوارد نشان داد که آستاگزانتین خالص دارای فعالیت ضد قارچی است. چرا که شمارش کلی قارچها و عدد هاوارد در تیمارهای حاوی ۳ و ۶ درصد آستاگزانتین خالص، بهصورت معنیداری کمتر از شاهد بود. مطابق نتایج، با نانو ریزپوشانی آستاگزانتین، فعالیت ضد قارچی آن بهصورت قابل ملاحظه ای ارتقا یافت و تیمارهای حاوی نانوکپسولهای حامل رنگدانه مقادیر کمتری از تعداد قارچها و عدد هاوارد را نسبت به تیمارهای حاوی آستاگزانتین خالص نشان دادند. همچنین از آنجا که این دو شاخص در تیمارهای حاوی ۶ و ۹ درصد نانوکپسولهای حامل آستاگزانتین فاقد اختلاف معنیدار هستند، بنابراین تیمار دارای ۶ درصد نانوکپسول، تیمار بهینه معرفی میشود.

استفاده از آستاگزانتین و نانوکپسولهای حامل آن در فرمولاسیون رب گوجهفرنگی سابقهای ندارد. اما در پارهای از مطالعات به خاصیت ضد قارچی این رنگدانه اشاره شده است. در تحقیقی که فعالیت ضد قارچی آستاگزانتین تولیدشده از مخمر (گونه *رودوسپوریدیوم پالودیژنوم*[1]) علیه دو گونههای قارچی *کاندیدا آلبیکانس*[2] و *کاندیدا گلابراتا*[3] ارزیابی شد، مشخص گردید که این رنگدانه از طریق ایجاد اختلال در غشای سلولی و اندامک میتوکندری باعث نانودی سلولهای قارچی میشود (Sartaj *et al*., 2022). البته در برخی از مطالعات، فعالیت ضد قارچی آستاگزانتین تائید نشد. در تحقیق احمد و همکاران (Ahmed *et al*., 2022) اگرچه فعالیت ضد باکتریایی آستاگزانتین مستخرج از میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* علیه باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس*[4]، *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیاکلی*[5] و *سودوموناس آئروژینوزا*[6] تائید شد اما این رنگدانه قادر به مهار رشد و تکثیر گونههای قارچی *آسپرژیلوس فومیگاتوس*[7] و *کاندیدا آلبیکانس* نبود.

فراوانی جنسهای قارچی در تیمارها

در شکل ۳، فلور قارچی تیمارهای تحقیق به صورت میانگین در روز ۲۸ نگهداری ارائه شده است. مطابق این شکل، فلور قارچی عمده رب گوجهفرنگی (در تیمارهای مختلف) مربوط به گونههای کپکی متعلق به جنس *پنیسلیوم*[8] میباشد. جنسهای *آسپرژیلوس*، مخمرها و سایر گونههای کپکی بهترتیب در رتبههای بعدی جای گرفتند (p<۰/۰۵). بهطور کلی به دلیل مقاومت پائین گونههای مخمر به دمای بالا، تعداد آنها در محصول نهایی (رب گوجهفرنگی) بسیار کم است (Arasteh, 1992). در پژوهشی که آلودگی قارچی رب گوجهفرنگی نگهداریشده در دمای صفر درجه سانتیگراد (بهمدت ۱۸۰ روز) ارزیابی شد، فلور عمده قارچی محصول مربوط به جنسهای *پنیسلیوم* و *آسپرژیلوس* بود (Elhami Rad & Shahidi., 2005) که این یافته مطابق نتایج پژوهش پیشرو است. در سایر تحقیقات نیز به وجود این جنسها بهعنوان فلور غالب رب گوجهفرنگی اشاره شده است (Kalyoncu, 2005; Karazhyan *et al*., 2016). این دو جنس از قارچها علاوه بر تولید متابولیتهای سمی نظیر اسیدتنوآزونیک، اثر قابل توجهی بر افزایش pH و در نتیجه کاهش کیفیت محصول دارند (Mundt, 1974). به همین دلیل مقابله با رشد این جنس از قارچها جهت کنترل کیفیت و افزایش ماندگاری رب گوجهفرنگی ضروری می باشد.

1- *Rhodosporidium paludigenum*
2- *Candida albicans*
3- *Candida glabrata*
4- *Staphylococcus aureus*
5- *Escherichia coli*
6- *Pseudomonas aeruginosa*
7- *Aspergillus fumigatus*
8- *Penicillium*

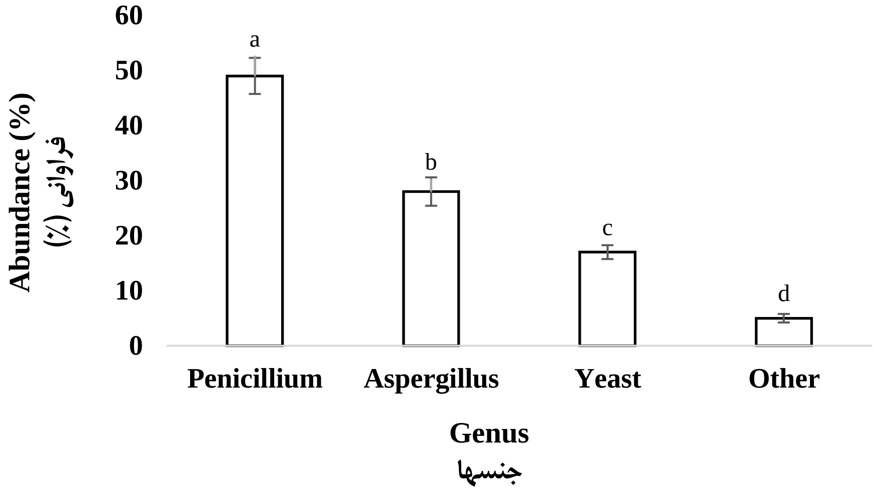


شکل ۲- عدد هاوارد تیمارهای تحقیق در طول دوره نگهداری (٪)

حروف متفاوت در هر روز نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (p<۰/۰۵).

Fig. 2. Howard value of the research treatments during the storage period (%)

Different letters in each day indicate significant difference between the data (p<0.05).



شکل ۳- میانگین فراوانی جنس‌های قارچی تیمارهای تحقیق در روز ۲۸ نگهداری (٪)

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (p<۰/۰۵).

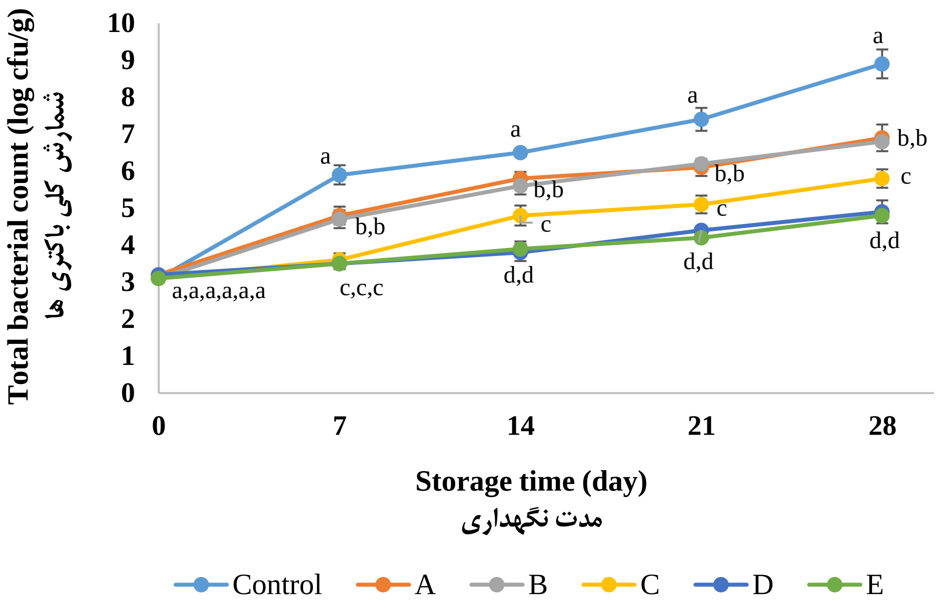
Fig. 3. Average abundance of fungal genus of research treatments on the 28th day of storage (%)

Different letters indicate significant difference between the data (p<0.05).

شمارش کلی باکتری‌ها

شکل ۴ شمارش کلی باکتری‌ها را در تیمارهای تحقیق نشان می-دهد. مطابق این شکل حداکثر شمارش باکتری‌ها مربوط به شاهد و حداقل آن مربوط به تیمارهای D و E (p>۰/۰۵) است (p<۰/۰۵). تیمار C تا روز هفت با دو تیمار مذکور اختلاف قابل ملاحظه‌ای نداشت (p>۰/۰۵) اما با گذشت زمان مقادیر بیشتری از باکتری‌های کل را نشان داد (p<۰/۰۵). تیمارهای A و B (p>۰/۰۵) نسبت به تیمار C از

نظر باکتری‌های کل در سطح بالاتری قرار داشتند (p<۰/۰۵). حداکثر شمارش باکتری‌های کل (روز ۲۸) در شاهد معادل ۸/۹ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم بود (p<۰/۰۵). این میزان در همین روز برای تیمارهای D و E حدود ۴/۸، در تیمار C، ۵/۸ و برای تیمارهای A و B برابر با ۶/۹ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم ثبت شد.



شکل ٤- شمارش کلی باکتری‌ها در تیمارهای تحقیق طی دوره نگهداری (Log cfu/g)

حروف متفاوت در هر روز نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (p<۰/۰۵).

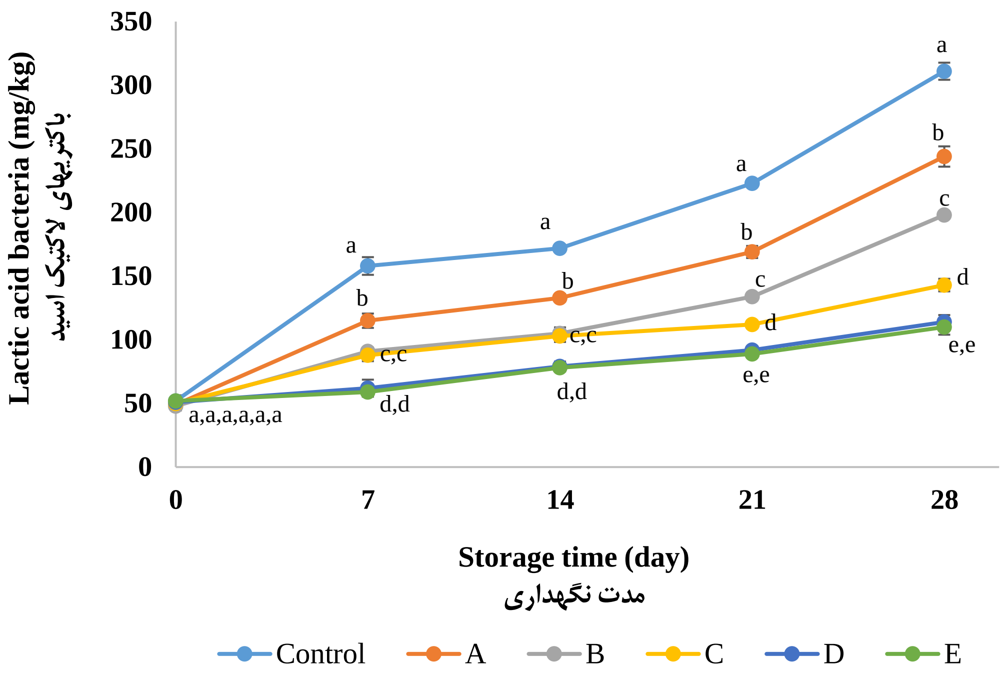
Fig. 4. Total counts of bacteria in the research treatments during the storage period (Log cfu/g)

Different letters in each day indicate a significant difference between the data (p<0.05).

باکتری‌های لاکتیک‌اسید

در شکل ۵ میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید در رب گوجه‌فرنگی در قالب شش تیمار شاهد و فرموله‌شده با آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن ارائه شده است. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود، تیمارهای D و E (p>۰/۰۵) در طول دوره نگهداری محتوی حداقل میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید هستند؛ به این صورت که در روز ۲۸ میزان باکتری‌های مذکور در این دو تیمار حدودا ۱۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. دو تیمار B و C ضمن عدم اختلاف معنی‌دار تا روز ۱۴(p>۰/۰۵)، حاوی مقادیر بیشتری از باکتری‌های مذکور نسبت به تیمارهای D و E بودند (p<۰/۰۵). تیمارهای A و شاهد به‌ترتیب در مراتب بعد قرار گرفتند (p<۰/۰۵). میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید در شاهد در روز ۲۸ معادل ۳۱۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود.

نتایج بخش شمارش باکتریایی تیمارهای تحقیق حاکی از آن است که آستاگزانتین در فرم خالص و نانو ریزپوشانی‌شده (نانوکپسول‌های حامل)، قابلیت مقابله با رشد و تکثیر سلول‌های باکتریایی را دارد اما کارائی و قدرت فرم نانو ریزپوشانی‌شده در این زمینه بیشتر از فرم خالص است. چرا که مطابق یافته‌ها، سطح شمارش باکتری‌های کل و لاکتیک‌اسید در تیمارهای حاوی نانوکپسول‌های حامل به صورت قابل ملاحظه‌ای کمتر از تیمارهای دارای آستاگزانتین خالص بود. از آنجا که دو تیمار حاوی ۶ و ۹ درصد نانوکپسول، از نظر سطوح باکتری‌های کل و لاکتیک‌اسید، فاقد اختلاف معنی‌دار هستند، بنابراین تیمار ۶ درصد، تیمار بهینه می‌باشد. حد مجاز میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید در مواد غذایی، ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است (Porretta & Vicini, 1993). در تیمارهای تحقیق حاضر، فقط شاهد از این حد عبور کرده است اما وجود آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن در سایر تیمارها، مانع از تجمع بیش از حد باکتری‌های لاکتیک‌اسید در رب گوجه‌فرنگی شده است که این مورد به توانایی بالای رنگدانه در مهار فساد باکتریایی اشاره دارد. تاکنون تحقیقی پیرامون استفاده از آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن به‌عنوان ترکیب ضد باکتری در فرمولاسیون رب گوجه‌فرنگی ثبت نشده است



شکل ۵- میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید در تیمارهای تحقیق طی دوره نگهداری (میلی‌گرم بر کیلوگرم)

حروف متفاوت در هر روز نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (p<۰/۰۵).

Fig. 5. Amount of lactic acid bacteria in the research treatments during the storage period (mg/kg)

Different letters in each day indicate significant difference between the data (p<0.05).

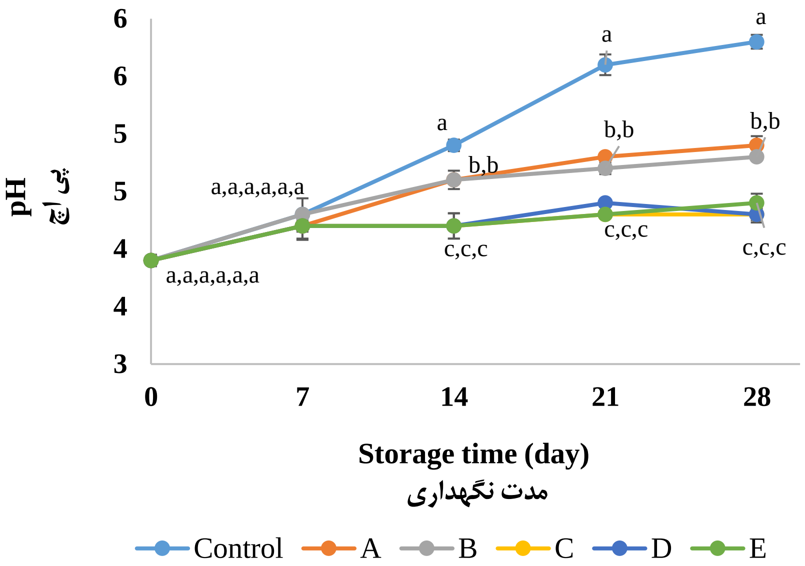
اما در پژوهش‌های بسیار محدودی به قابلیت آستاگزانتین جهت مقابله با فساد میکروبی و افزایش ماندگاری مواد غذایی مختلف اشاره شده است. طی تحقیقی از غلظت‌های مختلف تیمول و آستاگزانتین به عنوان جایگزین نیتریت در فرمولاسیون سوسیس پروبیوتیک استفاده شد. نتایج نشان داد که ترکیب این دو ماده در طول نگهداری سوسیس در دمای یخچال به‌مدت ۴۵ روز موجب کاهش باکتری‌های لاکتیک اسید وگونه *کلستریدیوم پرفرنژنز* س[1] می‌گردد (Mohammadpourfard *et al.*, 2021) که این نتیجه با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد. در پژوهش عبدالمالک و همکاران (Abdelmalek *et al.*, 2016) از آستاگزانتین استخراج‌شده از ضایعات میگو[2] به‌منظور افزایش زمان ماندگاری استیک مرغ در دمای یخچال استفاده شد. یافته‌های پژوهش مذکور مؤید آن بود که تیمار دارای آستاگزانتین نسبت به شاهد در مهار باکتری کل[3]، سرماگراها، کلیفرم مدفوعی[4]، استافیلوکوکوس و سالمونلا اثرگذاری بیشتری داشت و شمارش باکتری‌های مذکور به صورت معنی‌داری در این تیمار کمتر بود. این پژوهشگران عنوان کردند که افزودن آستاگزانتین طبیعی می‌تواند پایداری میکروبیولوژیکی استیک مرغ را در طول زمان نگهداری بهبود بخشد. تحقیقات مختلفی نیز فعالیت ضد باکتریایی آستاگزانتین را ارزیابی و نتایج مثبتی گزارش کردند. یافته‌های پژوهش و همکاران (Irna *et al.*, 2017) در زمینه فعالیت ضد باکتریایی (قطر هاله عدم رشد) آستاگزانتین استخراج‌شده از میگو[5] (با دو روش شیمیایی و فشار بالا) نشان داد که این رنگدانه قادر به مهار رشد و تکثیر باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *انتروباکتر آئروژنز*[6]، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* است. در تحقیق دیگری، رنگدانه آستاگزانتین با استفاده از روش حلال استون از سه گونه خرچنگ[7] استخراج و فعالیت ضد باکتریایی آن علیه باکتری *اشریشیاکلی* ایزوله‌شده از شیر و گوشت فاسد بررسی شد. یافته‌ها حاکی از قابلیت مطلوب رنگدانه در مقابله با باکتری مذکور بود. به گونه‌ای که قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از حدود ۵ تا ۱۲ میلی‌متر متغیر گزارش شد (Suganya & Asheeba, 2015).

pH

1- *Clostridium perfringens*
2- *Parapenaeus longirostris*
3- Total flora
4- Fecal coliform
5- *Penaeus monodon*
6- *Enterobacter aerogenes*
7 - *Portunus sanguinolentus*, *Callinectes sapidus*, *Paralithodes brevipes*

از شاخص‌های مهم ارزیابی روند فساد (میکروبی و اکسیداتیو) مواد غذایی، اندازه‌گیری pH است. شکل ۶ تغییرات pH تیمارهای تحقیق را در طول مدت نگهداری نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود، طی مدت نگهداری تیمارها در دمای یخچال، حداقل pH در سه تیمار C، D و E (p>۰/۰۵) و حداکثر آن در شاهد ثبت شد (p<۰/۰۵). دو تیمار A و B ضمن عدم اختلاف معنی‌دار (p>۰/۰۵)، دارای میزان pH بیشتر از تیمارهای C، D و E و کمتر از شاهد بودند (p<۰/۰۵). لازم به ذکر است که شاهد و پنج تیمار فرموله‌شده با آستاگزانتین و نانوکپسول‌های حامل آن تا روز ۷ دارای میزان pH تقریبا یکسانی بودند (p>۰/۰۵).

مطابق شکل ۶، سه تیمار C، D و E در طول دوره نگهداری دارای pH تقریبا ثابتی هستند. همچنین روند تغییرات pH در دو تیمار A و B دارای شیب کم و در شاهد با شیب بیشتری ثبت شده است. افزایش pH در طول دوره نگهداری در تیمارها احتمالا به دلیل رشد و تکثیر جنس‌های قارچی در رب گوجه‌فرنگی است. مخمرها و کپک‌ها از اسیدهای آلی به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. همچنین ازت این میکروارگانیسم‌ها جهت رشد و تکثیر از اسیدهای آمینه تامین می‌شود. در نتیجه این فعل و انفعلات، یون آمونیوم آزاد و موجب افزایش pH رب گوجه‌فرنگی می‌گردد (Uylaser & Basoglu, 1997). عامل دیگری که می‌تواند افزایش pH رب گوجه‌فرنگی را در طول زمان توجیه کند، واکنش‌هایی هستند که موجب تخریب و تجزیه اسیدسیتریک می‌شوند (Oladiran, 1992). لازم به ذکر است که در بین تیمارهای تحقیق، سه تیمار C، D و E نزدیک‌ترین pH را به pH استاندارد رب گوجه‌فرنگی (حدود ۴) دارند. pH تیمارهای مذکور در طول دوره نگهداری از ۳/۹ تا ۴/۴ متغیر بود.



شکل ٦- pH تیمارهای تحقیق در طول دوره نگهداری

حروف متفاوت در هر روز نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است (p<۰/۰۵).

Fig. 6. PH of the research treatments during the storage period

Different letters in each day indicate significant difference between the data ($p<0.05$).

ارزیابی حسی تیمارهای تحقیق

نتایج ارزیابی حسی تیمارهای تحقیق (در دو روز صفر و ۲۸) در جدول ۳ ارائه شده است. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، هر چهار شاخص رنگ، بو، مزه و بافت تیمارهای تحقیق در روز صفر از نظر امتیازهای کسب‌شده و متعاقبا پذیرش کلی تقریبا یکسان و فاقد اختلاف معنی‌دار هستند (p>۰/۰۵). مقایسه امتیازهای شاخص‌های حسی در روزهای صفر و ۲۸ نشان داد که این شاخص‌ها (به همراه پذیرش کلی) فقط در دو تیمار D و E در طول دوره نگهداری ثابت ماندند اما در سایر تیمارها با گذشت ۲۸ روز، شاخص‌های حسی (به غیر از بافت) و متعاقبا پذیرش کلی تیمارها به‌صورت منفی و معنی‌دار تغییر کردند (p<۰/۰۵). این یافته موید آن است نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین از طریق مقابله با رشد و تکثیر عوامل آلوده‌کننده میکروبی در رب گوجه‌فرنگی به حفظ شاخص‌های حسی طی یک ماه نگهداری در دمای یخچال کمک می‌کنند. با وجود اینکه (مطابق یافته‌ها) تیمارهای حاوی آستاگزانتین خالص قابلیت مقابله با فساد میکروبی را نسبت به شاهد داشتند اما در ارزیابی حسی، نتایج به گونه‌ای دیگر ثبت

شد. به این صورت که از کیفیت این تیمارها با گذشت زمان کاسته شد؛ گرچه شیب کاهش کیفیت خواص حسی با افزایش غلظت آستاگزانتین از صفر (شاهد) تا ۶ درصد، کمتر شد. برخلاف تصور و فرض اولیه که گمان می‌شد اضافه‌کردن آستاگزانتین (در هر دو فرم) به رب گوجه فرنگی به بهبود و یا تغییر رنگ محصول منجر می‌شود، چنین نتیجه‌ای ثبت نشد و از نظر ارزیابان رنگ محصول در شاهد و تیمارهای فرموله-شده در روز صفر اختلاف قابل ملاحظه‌ای نداشت. برخلاف دو تیمار D و E، کیفیت رنگ محصول در سایر تیمارها از نظر ارزیابان با گذشت ۲۸ روز به‌صورت چشمگیری کاهش یافت که این یافته نیز مؤید برتری نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین نسبت به آستاگزانتین خالص در حفظ رنگ رب گوجه‌فرنگی طی دوره نگهداری در یخچال می‌باشد. همانطور که در بالا عنوان شد، احتمالا مکانیسم نانوکپسول‌ها جهت حفظ رنگ مربوط به فعالیت ضد میکروبی آن‌هاست.

جدول ۳- ارزیابی حسی تیمارهای تحقیق در روزهای صفر و ۲۸

Table 3- Sensory evaluation of research treatments on days 0 and 28

تیمارها/شاخص‌ها Treatments/indices	زمان Time (day)	رنگ Color	بو Aroma	مزه Taste	بافت Texture	پذیرش کلی General acceptance
Control	0	7.89±0.12ᵃ	6.32±0.29ᵃ	7.19±0.95ᵃ	7.38±1.14ᵃ	7.19±0.81ᵃ
شاهد	28	3.51±0.1ᵈ	2.86±0.18ᵈ	3.92±0.09ᵈ	7.35±0.83ᵃ	4.41±0.1ᵈ
A	0	7.86±0.39ᵃ	6.39±0.86ᵃ	7.26±0.96ᵃ	7.45±1.03ᵃ	7.24±1.05ᵃ
	28	3.62±0.07ᵈ	2.92±0.15ᵈ	3.83±0.11ᵈ	7.53±0.56ᵃ	4.47±0.04ᵈ
B	0	7.91±0.51ᵃ	6.33±0.19ᵃ	7.2±1.08ᵃ	7.41±0.93ᵃ	7.21±0.38ᵃ
	28	4.78±0.09ᶜ	3.71±0.04ᶜ	4.69±0.1ᶜ	7.46±1.18ᵃ	5.16±0.03ᶜ
C	0	7.84±0.55ᵃ	6.41±0.82ᵃ	7.23±0.79ᵃ	7.51±1.32ᵃ	7.24±0.88ᵃ
	28	6.12±0.2ᵇ	5.05±0.52ᵇ	5.98±0.08ᵇ	7.44±1.26ᵃ	6.14±0.05ᵇ
D	0	7.92±0.48ᵃ	6.38±0.73ᵃ	7.18±0.15ᵃ	7.42±0.84ᵃ	7.23±0.69ᵃ
	28	7.75±0.64ᵃ	6.33±0.4ᵃ	7.09±0.76ᵃ	7.49±1.15ᵃ	7.16±0.31ᵃ
E	0	7.88±0.84ᵃ	6.34±0.12ᵃ	7.18±0.53ᵃ	7.43±1.08ᵃ	7.2±0.18ᵃ
	28	7.87±0.39ᵃ	6.42±0.25ᵃ	7.21±0.19ᵃ	7.52±0.96ᵃ	7.26±0.78ᵃ

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ($p<0.05$).

Different letters in each column indicate significant difference between the data ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری

آستاگزانتین استخراج‌شده از میکروجلبک *هماتوکوکوس پلوویالیس* بااستفاده از روش ترکیبی اسید–استون قابلیت مهار فساد قارچی و باکتریایی رب گوجه‌فرنگی سنتی نگهداری‌شده در دمای یخچال را در بازه زمانی یک ماهه دارد. این قابلیت رنگدانه مستخرج با نانوریزپوشانی آن با استفاده از پوشش ترکیبی مالتودکسترین–کازئینات سدیم به صورت قابل توجهی ارتقا می‌یابد. استفاده از آستاگزانتین با مقادیر ۳ و ۶ درصد فرم خالص و همچنین ۳، ۶ و ۹ درصد نانوکپسول‌های حامل در فرمولاسیون رب گوجه‌فرنگی نشان داد که تیمار حاوی ۶ درصد نانوکپسول‌های حامل آستاگزانتین به‌منظور مهار رشد میکروب‌ها و حفظ خصوصیات کیفی و حسی محصول طی دوره نگهداری در دمای یخچال بهینه است. با توجه به مثبت‌بودن نتایج این تحقیق، پیشنهاد می‌شود از آستاگزانتین در دو فرم خالص و نانو ریزپوشانی‌شده در مقیاس صنعتی تولید رب گوجه فرنگی نیز استفاده و خصوصیات کیفی و میکروبی محصول طی دوره نگهداری در دماهای مختلف (۴ و ۱۸- درجه سانتی‌گراد) بررسی شود. پیشنهاد دیگر مربوط به تغییر پوشش نانوکپسول‌ها است؛ به این صورت که از یک ترکیب ضد میکروب مانند کیتوزان به‌عنوان جایگزین مالتودکسترین در پوشش استفاده و فعالیت ضد میکروبی نانوکپسول‌های حامل رنگدانه با پوشش ترکیبی کیتوزان–کازئینات سدیم در فرمولاسیون رب گوجه فرنگی ارزیابی گردد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۳-۱۴۰۱-۰۳ انجام شد که به این وسیله سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Arasteh, N. (1992). *Identification of spore producing bacteria in tomato paste*, Master's thesis, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian)
2. Abdelmalek, B.E., Sila, A., Ghlissi, Z., Taktak, M.A., Ayadi, M.A., & Bougatef, A. (2016). The influence of natural astaxanthin on the formulation and storage of marinated chicken steaks. *Journal of Food Biochemistry*, *40*(4), 393-403. https://doi.org/10.1111/jfbc.12224

3. Ahmed, E.A., Mohamed, H.E., & Abd El-Salam, H.S. (2022). In vitro antimicrobial activity of astaxanthin crude extract from *Haematococcus pluvialis*. *Egyptian Journal of Aquatic Biology*, *26*, 95-106. https://dx.doi.org/10.21608/ejabf.2022.224854
4. Battilani, P., Chiusa, G., Cervi, C., Trevisan, M., & Ghebbioni, C. (1996). Fungal growth and ergosterol content in tomato fruits infected by fungi. *Italian Journal of Food Science*, *4*, 283-289.
5. Bennedsen, M., Wang, X., Willén, R., Wadström, T., & Andersen, L.P. (2000). Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunology Letters*, *70*(3), 185-189. https://doi.org/10.1016/S0165-2478 (99)00145-5
6. Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Wang, S., & Liu, Y. (2014). Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*, 1-7. https://doi.org/10.1155/2014/694305
7. Dewati, P. R., Rohman, A., & Budiman, A. (2020). A Preliminary Study of Extraction and Purification Processes of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialisas* a Natural Antioxidant. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 778, No. 1, p. 012032). IOP Publishing.
8. Elhami Rad, A., & Shahidi, F. (2005). Identification of bulk tomato paste fungal contamination in cold store and determination of prevalence for different species. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *1*(1), 19-26. (In Persian)
9. Elhami Rad, A., & Shahidi, F. (2007). Evaluation of physicochemical and microbial changes of bulk tomato paste during cold storage. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, *8*(1), 171-180. (In Persian)
10. Gu, Z., Deming, C., Yongbin, H., Zhigang, C., & Feirong, G. (2008). Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. *LWT-Food Science and Technology*, *41*(6), 1082-1088. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.07.005
11. Huhtanen, C.N., Naghski, J., Custer, C.S., & Russell, R.W. (1976). Growth and toxin production by Clostridium botulinum in moldy tomato juice. *Applied and Environmental Microbiology*, *32*(5), 711-715. https://doi.org/10.1128/aem.32.5.711-715.1976
12. Hasan, H.A.H. (1995). Alternaria mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production. *Mycopathologia*, *130*(3), 171-177. https://doi.org/10.1007/BF01103101
13. Hasani, Sh., Shahidi, M., & Ojagh, M. (2018). The production and evaluation of nanoliposomes containing bioactive peptides derived from fish wastes using the alkalase enzyme. *Research and Innovation in Food Science and Industry*, *8*(1), 31-44. (In Persian)
14. Irna, C., Jaswir, I., Othman, R., & Jimat, D.N. (2017). Document details. *International Food Research Journal*, *24*, 508-513.
15. Jacques, S. (1999). The potential preventive effects of vitamins for cataract and age-related macular degeneration. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, *69*(3), 198-205. https://doi.org/10.1024/0300-9831.69.3.198
16. Kalyoncu, F. (2005). Determination of fungi associated with tomatoes (*Lycopersicum esculentum* M.) and tomato pastes fatih kalyoncu, A. usame tamer and mustafa oskay. *The Plant Pathology Journal*, *4*(2), 146-9.
17. Kang, C.D., & Sim, S.J. (2007). Selective extraction of free astaxanthin from Haematococcus culture using a tandem organic solvent system. *Biotechnology Progress*, *23*(4), 866-871. https://doi.org/10.1021/bp0700354
18. Khaleghi, A., Rezaei K., Kasai, M., Khosravi, K., & Soleymani, M. (2013). Evaluation of antioxidant properties of *Berberis crataegina* extract on fat oxidation of beef sausages during refrigerated storage. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, *7*(5), 345-353. (In Persian)
19. Karazhyan, R., Habibi, M., Yavarmanesh, M., Edalatian, M., & Pourianfa, H. (2016). *Aspergillus niger* measurement in tomato paste using Real Time, *Journal of Applied Microbiology in Food Industry*, *2*(1), 1-14. (In Persian)
20. Liu, Z.W., Zeng, X.A., Cheng, J.H., Liu, D.B., & Aadil, R.M. (2018). The efficiency and comparison of novel techniques for cell wall disruption in astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Food Science and Technology*, *53*(9), 2212-2219. https://doi.org/10.1111/ijfs.13810
21. Mundt, J.O. (1978). Effect of mold growth on the pH of tomato juice. *Journal of Food Protection*, *41*(4), 267-268. https://doi.org/10.4315/0362-028X-41.4.267
22. Mortazavi, A., & Tabatabaei, F. (1997). Fungal toxins. Publications of Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian)
23. Machado, A.R., Assis, L.M., Costa, J.A.V., Badiale-Furlong, E., Motta, A.S., Micheletto, Y.M.S., & Souza-Soares, L. A. (2014). Application of sonication and mixing for nanoencapsulation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in liposomes. *International Food Research Journal*, *21*(6), 2201-2214.
24. Mohammadpourfard, I., Khanjari, A., Akhonzadeh Basti, A., Herrero-Latorre, C., Shariatifar, N., & Hosseini, H. (2021). Evaluation of microbiological, chemical, and sensory properties of cooked probiotic sausages containing

different concentrations of astaxanthin, thymol, and nitrite. *Food Science and Nutrition*, *9*(1), 345-356. https://doi.org/10.1002/fsn3.2000

25. Oladiran, A.O., & Iwu, L.N. (1992). Changes in ascorbic acid and carbohydrate contents in tomato fruits infected with pathogens. *Plant Foods for Human Nutrition*, *42*(4), 373-382. https://doi.org/10.1007/BF02194098
26. Porretta, S., & Vicini, E. (1993). Changes in tomato pulp quality caused by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Science & Technology*, *28*(6), 611-616.
27. Palozza, P., Torelli, C., Boninsegna, A., Simone, R., Catalano, A., Mele, M.C., & Picci, N. (2009). Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Letters*, *283*(1), 108-117. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.03.031
28. Ramezanzade, L., Hosseini, S.F., & Nikkhah, M. (2017). Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chemistry*, *234*, 220-229. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.177
29. Reyhani Poul, S., & Yeganeh, S. (2022). Physicochemical and antioxidant properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with bioactive peptides produced from shrimp wastes hydrolysis. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *21*(4), 987-1003. https://doi.org/10.22092/ijfs.2022.126498
30. Samano, S.G. (1983). The capability of some common tomato molds to produce mycotoxins and their relationship to Howard mold count. *Dissertation Abstracts International*, *41*(4), 1049.
31. Sarada, R., Vidhyavathi, R., Usha, D., & Ravishankar, G.A. (2006). An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(20), 7585-7588. https://doi.org/10.1021/jf060737t
32. Suganya, V., & Asheeba, S. (2015). Antioxidant and antimicrobial activity of astaxanthin isolated from three varieties of crabs. *International Journal of Recent Scientific Research*, *6*(10), 6753-6758.
33. Sun, W., Lin, H., Zhai, Y., Cao, L., Leng, K., & Xing, L. (2015). Separation, Purification, and Identification of (3S, 3′ S)-trans-Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, *50*(9), 1377-1383. https://doi.org/10.1080/01496395.2014.976873
34. Safari, R., Mirbakhsh, M., Ghaffari, H., Reyhani Poul, S., Rahmati, R., & Ebrahimzadeh, M. (2022a). Effect of temperature, pH, and time factors on the stability and antioxidant activity of the extracted astaxanthin from haematococcus microalgae (*Haematococcus pluvialis*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, *31*(1), 109-120. (In Persian). http://dorl.net/dor/20.1001.1.10261354.1401.31.1.10.2
35. Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S., & Ghaffari, H. (2022b). Nanoencapsulation of phycocyanin extracted from the alga Spirulina (*Spirulina platensis*) and use of resulting nanoparticles in ice cream formulation. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, *123*(19), 145-159. (In Persian). http://doi.org/10.52547/fsct.19.123.145
36. Sartaj, K., Gupta, P., Tripathi, S., Poluri, K.M., & Prasad, R. (2022). Insights into the extraction, characterization and antifungal activity of astaxanthin derived from yeast de-oiled biomass. *Environmental Technology and Innovation*, *27*, 102437. https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102437
37. Tanaka, T., Morishita, Y., Suzui, M., Kojima, T., Okumura, A., & Mori, H. (1994). Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis*, *15*(1), 15-19. https://doi.org/10.1093/carcin/15.1.15
38. Tracy, R.P. (1999). Inflammation markers and coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology*, *10*(5), 435-441. https://doi.org/10.1097/00041433-199910000-00008
39. Uylaser, V., & Basoglu, F. (1997). Research on changes of bacteria and yeasts and effects of spoilage on tomato paste production stage. Gida, *22*(1), 62-85
40. Uchiyama, K., Naito, Y., Hasegawa, G., Nakamura, N., Takahashi, J., & Yoshikawa, T. (2002). Astaxanthin protects β-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Report*, *7*(5), 290-293. https://doi.org/10.1179/135100002125000811
41. Yuan, J.P., & Chen, F. (2000). Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry*, *68*(4), 443-448. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00219-8
42. Yan, M., Liu, B., Jiao, X., & Qin, S. (2014). Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and Bioproducts Processing*, *92*(1), 89-97. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.07.008